

4. Сидоров Г.П., Братцев А.А., Захаров А.Б. Влияние техногенной эрозии долины на рыб р. Кожим // Биология атлантического лосося на европейском Севере СССР. Сыктывкар. 1990. С. 134–144. (Тр. Коми НЦ УрО РАН СССР; № 114).

5. Лукьяненко В.И. Экологические аспекты ихтиотоксикологии. М. 1987. 240 с.

6. Мордохай-Болтовской Ф.Д. Исследования Института биологии внутренних вод АН СССР по влиянию теплоэлектростанций на биологию водоемов // Водные ресурсы. 1975. № 6. С. 88–105.

7. Никаноров Ю.И. Влияние сбросных вод тепловых электростанций на ихтиофауну и рыбное хозяйство водоемов-охладителей // Биологический режим водоемов-охладителей ТЭЦ и влияние температуры на гидробионтов. М. 1977. Т. 21. С. 135–156.

8. Гор Д.А. Механизмы заселения и улучшения условий обитания донных беспозвоночных в восстанавливаемых руслах рек // Восстановление и охрана малых рек: Теория и практика. М. 1989. С. 100–122.

УДК 575.22; 502.4

Анализ жизнеспособности популяций особо охраняемых видов на примере *Helix pomatia* L. (*Mollusca, Gastropoda, Pulmonata*)

© 2010. Э. А. Снегин, к.б.н., доцент, зав. лабораторией, Белгородский государственный университет, e-mail: snegin@bsu.edu.ru

На основе анализа морфологической и генетической изменчивости, выявляемой методом гель-электрофореза белков, изучено состояние генофондов трёх популяций особо охраняемого вида *Helix pomatia* L. (виноградной улитки) в условиях юга лесостепи Среднерусской возвышенности. Рассматриваются генетико-автоматические процессы в популяциях и определяются векторы естественного отбора под влиянием как естественных, так и антропогенных факторов. Выдвигается гипотеза происхождения изучаемых популяций в районе исследования. На основе расчёта эффективной численности дается прогноз времени существования популяций.

The state of genofunds of three populations of the specially protected species *Helix pomatia* L. (edible snail) in conditions of southern forest-steppe of Mid-Russia Hills was investigated on the basis of the analysis of morphological and genetic changeability determined by the method of proteins' gelelectroforez. Genetic-automatic processes are considered in the populations and the vectors of natural selection under the influence of both natural and anthropogenic factors are determined. The hypothesis of the origin of the populations studied within the area in question is put forward. On basis of effective number calculation the lifetime of populations is forecasted.

Ключевые слова: особо охраняемый вид, наземный моллюск, популяционные генофонды, лесостепной ландшафт

Key words: specially protected species, land snail, population genofunds, forest-steppe landscape

Введение

В настоящее время, на фоне негативного воздействия человека на свое окружение, всё большее число диких видов сокращает свою численность, а порой целиком исчезает с лица планеты. Исчезновение любого вида начинается с исчезновения его отдельных популяций, в результате значительно сокращается ареал, уменьшается генетическое разнообразие и, как следствие, происходят потеря устойчивости и вымирание. По этой причине сейчас соз-

даются региональные Красные книги, нацеленные в первую очередь на сохранение различных внутривидовых группировок, в том числе и популяций. Часто бывает так, что вид, занесённый в региональную Красную книгу, в целом широко распространён, в отдельных частях ареала достигает большой численности и соответственно не нуждается в охране. Однако в ряде мест (например, на границах ареала или в каких-то полуизолированных территориях) такой вид или, вернее сказать, популяции этого вида могут находиться

в депрессивном состоянии. Изучая и сохраняя эти группировки, мы сохраняем уникальный генофонд этого вида и тем самым способствуем более длительному его существованию в пространстве и во времени.

Таким видом является виноградная улитка (*Helix pomatia* L.), занесённая в Красную книгу Белгородской области [1]. Сохранение популяций виноградной улитки на территории России необходимо не только для сохранения вида в целом как важного компонента экосистем, а также в связи с тем, что этот моллюск имеет важное эстетическое значение, а в ряде регионов рассматривается как перспективный пищевой объект.

Одно из основных положений популяционной генетики состоит в том, что если в изолированной популяции в течение нескольких поколений сохраняется лишь небольшое число особей, то генетическая изменчивость такой популяции уменьшается из-за увеличения инбридинга и потери части генофонда. А уровень генетической изменчивости, как известно, влияет на вероятность выживания популяций в течение длительного времени, поскольку является предпосылкой эволюционных адаптаций к меняющимся условиям среды. Поэтому центральное место в проектах долговременного контроля за состоянием популяций, включая популяции уязвимых

видов, должно быть отведено анализу их численности и генетической изменчивости [2].

Исходя из этих представлений, была сформулирована основная цель работы, которая заключается в оценке жизнеспособности популяций виноградной улитки на юге Среднерусской возвышенности на основе конхиологических и биохимических маркеров, а также на основе анализа эффективной численности.

Методика

Материалом для исследования послужили коллекционные сборы моллюсков из трёх пунктов, проведённые в течение последних восьми лет (рис. 1). Улитки собирались вручную в сырую погоду со стеблей и листьев растений, часто в подстилке. В каждом биотопе делалось четыре выборки на участках площадью 2 м² каждый. Собранные раковины *H. pomatia* использовались для морфометрического анализа конхиологических признаков. Анализу подвергались только взрослые особи, образовавшие отворот устья. Схема промеров раковины показана на рисунке 2.

Все параметры измерялись в миллиметрах с точностью до десятых долей штангенциркулем. Всего было изучено 253 экземпляра раковин этого моллюска.

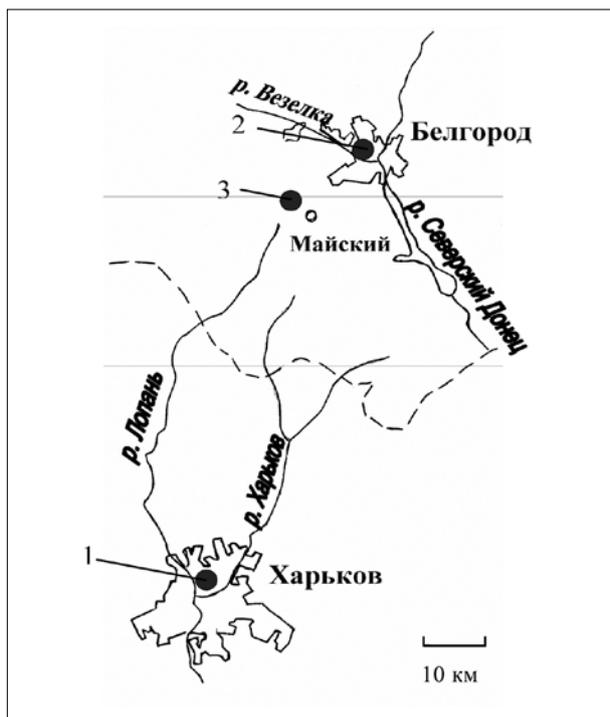


Рис. 1. Карта района исследования: 1 – колония «Харьков», 2 – колония «Белгород», 3 – колония «Майский»

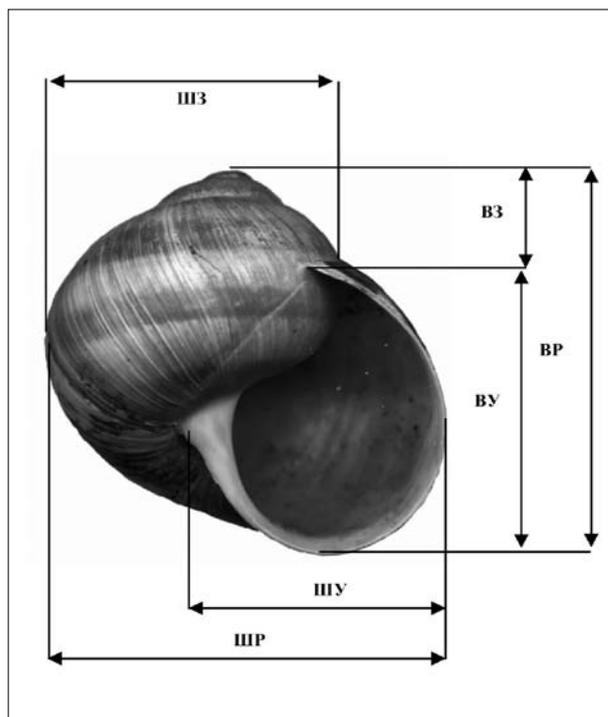


Рис. 2. Схема промеров раковины: ВР – высота раковины, ШП – ширина раковины, ВЗ – высота завитка, ШЗ – ширина завитка, ВУ – высота устья, ШУ – ширина устья

Исследование генетической структуры трёх изучаемых популяций было проведено с помощью метода электрофореза белков в полиакриламидном геле. Образцы тканей были взяты из криобанка научно-исследовательской лаборатории популяционной генетики и гентоксикологии Белгородского государственного университета. Для анализа был использован локус димерной неспецифической эстеразы Est4 с тремя аллелями. Наследование данного локуса идёт по кодоминантному типу, в результате на электрофореграммах можно выделить шесть фенотипических комбинаций (рис. 3). Всего было исследовано 345 особей.

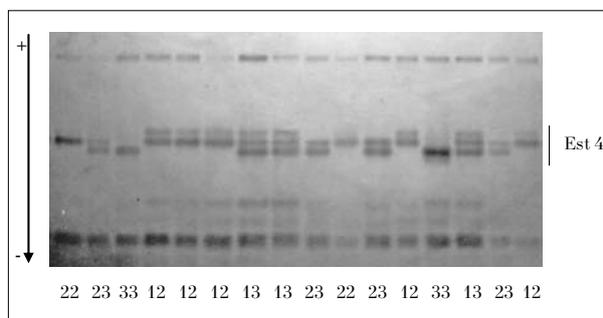


Рис. 3. Фрагмент электрофореграммы неспецифических эстераз *H. pomatia* из колонии «Белгород» (внизу представлены генотипы локуса Est 4, на рисунке отсутствует генотип 11)

Электрофоретический анализ. Экстракцию водорастворимых белков проводили из небольшого фрагмента ноги моллюсков¹, путём замораживания при -80 °С с последующим оттаиванием и механическим измельчением тефлоновым гомогенизатором в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 6,7). Электрофорез изоферментов проводился в 10 % полиакриламидном геле в камере VE-3 («Helicon»). Гелевый трис-НСl-буфер (концентрирующий гель рН 6,7, разделяющий гель рН 8,9); электродный трис-глициновый-буфер (рН 8,3). Окрашивание блоков на выявление неспецифических эстераз проводилось в субстратной смеси: трис-НСl (рН 7,4), α-нафтилацетат, прочный красный TR. Обработка полученных данных проводилась с использованием программы GenAlEx [3].

Результаты и обсуждение

Одними из важных показателей, по которым можно судить о состоянии популяций наземных моллюсков, являются различные признаки раковины, которые могут чутко реагировать на изменения окружающей обстановки. Согласно полученным данным, приведённым в таблице 1, достоверно наибольшие показатели конхиологических признаков имеют представители из группы «Майский». Здесь особи обитают на границе агроландшафта, вдали от источников воды. Вероятно, это

способствовало отбору в направлении более крупных улиток, способных сохранять влагу в условиях летних длительных засух, которые ежегодно наблюдаются в районе исследования. Две другие группы обитали во влажных поймах, особенно популяция «Белгород», для которой отмечены наименьшие показатели по большинству промеров. Эта группа населяет заросли пойменной растительности в десяти метрах от уреза воды. Формированию меньших размеров особей в этой колонии, возможно, способствовала, кроме того, значительная рекреационная нагрузка (места обитания улиток часто посещаются людьми), в результате которой улитки с более крупными раковинами чаще гибли под ногами посетителей. Различия колоний по морфометрическим показателям, очевидно, обусловлены и особенностями генофондов сравниваемых групп.

Согласно представленным в таблице 2 данным, во всех трёх популяциях улиток с наибольшей частотой встречается аллель Est4-2. На втором месте по частоте встречаемости в популяциях «Харьков» и «Белгород» стоит аллель Est4-1, в популяции «Майский» – аллель Est4-3.

Что касается количества реализованных фенотипических комбинаций, то наибольший показатель индекса Шеннона зафиксирован в колонии «Белгород», немного уступают ей

Таблица 1

Значения морфометрических признаков раковины в популяциях *H. pomatia*

Популяция	N	ВЗ	ШЗ	ВР	ШР	ВУ	ШУ
«Харьков»	71	9,8±0,9	23,9±0,8	33,9±1,1	34,2±0,9	24,1±0,8	18,4±0,7
«Белгород»	115	11,2±0,9	23,6±0,9	31,4±1,2	30,7±0,9	20,2±0,7	18,9±0,7
«Майский»	67	11,3±0,7	26,2±0,8	37,4±1,1	36,0±0,9	26,0±0,9	22,9±1,4

Примечание: N – количество промеренных раковин. Обозначение морфометрических признаков как на рис. 2.

¹ Во время сборов у каждого живого моллюска отщипывался небольшой фрагмент ноги (40 мг). Такой способ позволял избавиться от умерщвления животного и не наносить ущерб исследуемым популяциям.

Таблица 2

Частоты аллелей и показатели генетического разнообразия популяций *H. pomatia*

Колонии	N	Частоты аллелей Est4	A_e	I	H_o	H_e	F
«Харьков»	57	1 - 0,202 2 - 0,746 3 - 0,053	1,7	0,697	0,421	0,401	-0,051
«Белгород»	171	1 - 0,202 2 - 0,637 3 - 0,161	2,1	0,904	0,561	0,527	-0,065
«Майский»	117	1 - 0,021 2 - 0,637 3 - 0,342	1,9	0,737	0,308	0,477	0,355

Примечание: A_e – эффективное число аллелей на локус; I – индекс Шеннона; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность, F – коэффициент инбридинга.

колонии «Майский» и «Харьков». Об этом же говорят такие показатели, как эффективное число аллелей (A_e), которое отражает долю участия аллелей в формировании гетерозигот и уровень гетерозиготности (H_o). Согласно расчётам, наибольший уровень гетерозиготности (0,561) и наибольшее эффективное число аллелей (2,1) отмечены в популяции «Белгород».

Второе и третье места разделили популяции «Харьков» и «Майский», соответственно. Однако стоит отметить, что значения коэффициента инбридинга, рассчитанные на основе сопоставления наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (по закону Харди-Вайнберга), демонстрируют нам явный дефицит гетерози-

готных фенотипов в популяции «Майский». Две другие популяции стоят ближе к точке равновесия по этому показателю.

Из представленных данных видно, что колонии «Харьков» и «Белгород» более сходны как по соотношению частот аллелей и фенотипов эстераз, так и по большинству конхиологических признаков. Этот вывод подтверждают результаты кластерного анализа, проведённого по морфометрическим данным, а также значения генетического расстояния, вычисленные по Ней [7] на основе частот аллелей эстераз (рис. 4). Такая корреляция демонстрирует, что метрические параметры раковины определяются как факторами среды, так и генетической конституцией животных.

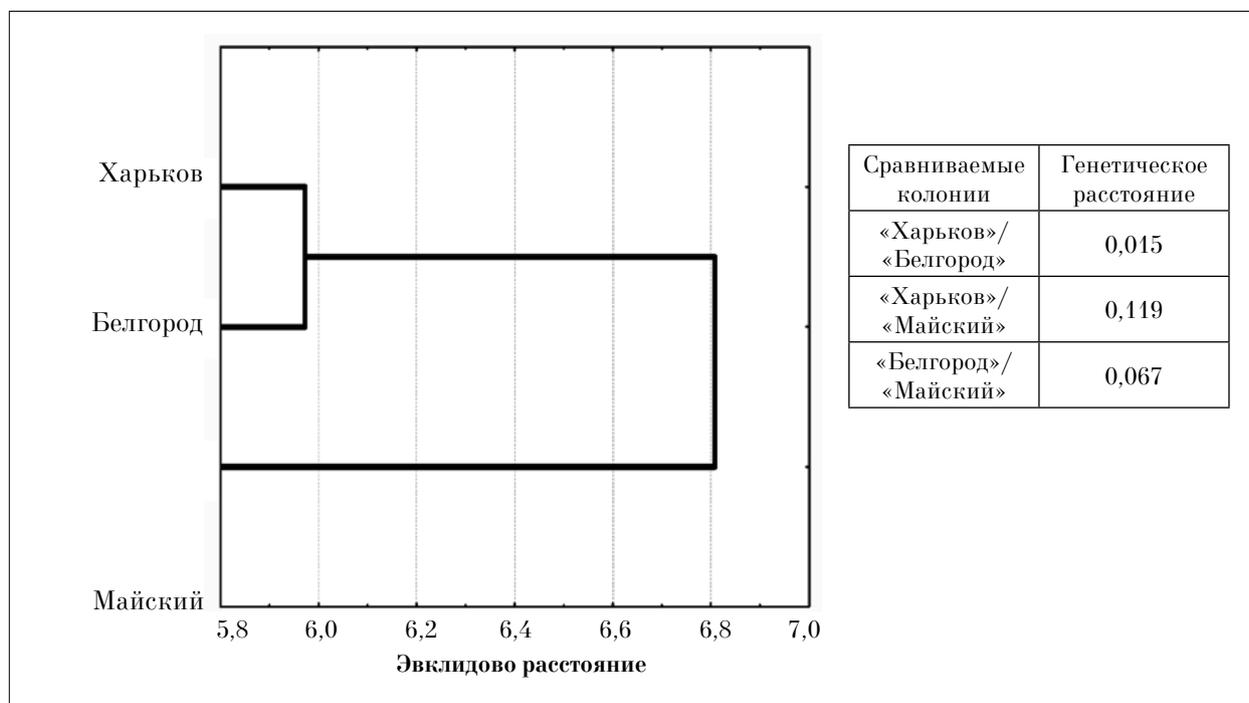


Рис. 4. Дендрограмма эвклидова расстояния, вычисленного на основе сопоставления конхиологических признаков и значения генетического расстояния по Ней [7]

Ранее нами была выдвинута гипотеза, что колонии «Майский» и «Белгород» являются результатом интродукции, поскольку эти группы виноградных улиток были обнаружены нами сравнительно недавно (первые находки датируются 2000 г.), причем в густо населённых и часто посещаемых людьми районах. Кроме того, в фаунистических сводках прошлых лет виноградная улитка на территории Белгородской области отмечалась только в Валуйском районе [4], где в настоящее время нами были найдены только пустые раковины давно погибших моллюсков¹. Популяция же из города Харькова известна малакологам с конца девятнадцатого – начала двадцатого века [5]. Результаты сравнения дают основание предполагать, что популяция «Белгород» является родственной и такой же старой, как и популяция «Харьков», но существовала она, вероятно, на каких-то смежных территориях и поэтому не была замечена исследователями. Популяция же «Майский», скорее всего, имеет иное происхождение. Судя по малым значениям уровня гетерозиготности и высокому показателю коэффициента инбридинга, генофонд этой группы находится в разбалансированном состоянии, что является следствием либо эффекта основателя [6], либо результатом изоляции. Немаловажным, на наш взгляд, является и тот факт, что эта популяция обитает в лесополосе на границе сельскохозяйственных полей с частым применением пестицидов. Вероятно, такой химический прессинг вызывает существенные колебания численности моллюсков, что находит отражение в соотношении частот аллелей и фенотипов.

На основе полученных результатов был сделан прогноз длительности существования изучаемых колоний виноградной улитки на исследуемых территориях с учётом эффективной численности популяций (N_e), которая в нашем случае была рассчитана на основе

изменчивости индивидуальной плодовитости для животных гермафродитов [8]:

$$N_e = \frac{4N-2}{2V+2} \quad V = \frac{\sum(k_i - k)^2}{N},$$

где N – численность половозрелых особей в популяции, V – дисперсия индивидуальной плодовитости, k_i – плодовитость отдельной особи, k – средняя плодовитость.

Расчёты по восемнадцати кладкам показывают, что количество яиц в одной кладке *H. pomatia* в среднем составляет $50,5 \pm 12$, $V=23,5$. Общее количество половозрелых улиток в популяциях рассчитывалось с учётом применяемой методики сбора. Расчёт времени существования изучаемых популяций проводился с использованием формулы [9]:

$$t = 1,5N_e,$$

где t – количество поколений.

Процесс убыли гетерозиготности за t поколений рассчитывался по формуле [8]:

$$H_t = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t H_0,$$

где H_0 – уровень гетерозиготности в начальной точке.

Учитывая, что продолжительность жизни одного поколения составляет в среднем восемь лет [10], был проведён расчёт общей продолжительности жизни изучаемых популяций в годах. Данные расчетов приведены в таблице 3.

Безусловно, полученный прогноз осуществим только при естественном существовании популяций, без продолжающегося давления на них со стороны человека. Учитывая, что изучаемые популяции находятся в крайне уязвимом географическом положении (на территории населённых пунктов), время существования их, вероятно, будет сокращено.

Таблица 3

Прогноз времени существования исследуемых популяций *H. pomatia*

Популяции	Общая численность половозрелых особей	Эффективная численность (N_e)	Время существования в поколениях	Время существования в годах	Уровень гетерозиготности в конце срока существования
«Харьков»	1500	118	177	1416	0,207
«Белгород»	750	59	88,5	708	0,225
«Майский»	240	19	28,5	228	0,145

¹ Две пустые раковины были найдены на территории санатория «Красная поляна», и еще десять раковин у подножия памятника природы «Лисья гора» возле поселка Яблоново.

На основании выше изложенного материала можно заключить, что две популяции виноградной улитки («Харьков» и «Белгород») находятся в удовлетворительном состоянии. Опасение вызывает популяция «Майский». Довольно высокий коэффициент инбридинга и низкая эффективная численность свидетельствуют о депрессивном состоянии этой группы улиток.

Литература

1. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание/ Под ред. Присного А.В. Белгород: 2004. 532 с.
2. Динамика популяционных генофондов при антропогенным воздействиях / Под. ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука. 2004. 618 с.
3. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reseach. Australion National University, Canberra, Australia. 2001. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.

4. Величковский В.А. Моллюски. Очерк фауны Валуйского уезда Воронежской губернии. Харьков: 1910. Вып. 6. 111 с.

5. Белецкий П. Материалы к познанию фауны моллюсков России. Моллюски кл. Gastropoda Харьковской губернии // Тр. Харьковск. общ. испыт. прир. Харьков: 1918. № 49. С. 31–42.

6. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир. 1968. 398 с.

7. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numba of individuals // Genetics. 1978. V. 89. P. 583–590.

8. Crow J.F., Kimura M. An introduction to population genetics theory. N.Y.: Harpers and Row. 1970. 591 pp.

9. Soule M.E. What is conservation biology? // Bioscience. 1985. № 35. P. 727–734.

10. Румянцева Е.Г. Эколого-биологические особенности и пути рационального использования виноградной улитки *Helix pomatia* L. в Калининградской области: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Калининград: РГУ им. И. Канта. 2006. 25 с.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РНПВШ № 2.2.3.1/3723, РФФИ № 09-04-97513 р_центр_а.